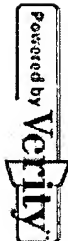




Publication	Pub. Date	Filed	Title
<input checked="" type="checkbox"/> CN1472342A	2004-02-04	2003-06-26	Reagent box for quantitatively inspecting number of copies of sars virus
1 family members shown above			

Other Abstract  
Info:

CHEMABS 142(16)292436K



[Nominate this for the Gallery...](#)

THOMSON

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)

Copyright © 1997-2006 The Thomson Corporation

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12Q 1/68

G01N 33/50



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03129553.3

[43] 公开日 2004 年 2 月 4 日

[11] 公开号 CN 1472342A

[22] 申请日 2003.6.26 [21] 申请号 03129553.3

[71] 申请人 上海科华生物工程股份有限公司

地址 200233 上海市漕河泾新兴技术开发区  
钦州北路 1189 号

[72] 发明人 华锦彪 周科隆 高爱武

[74] 专利代理机构 上海市华诚律师事务所

代理人 徐申民

权利要求书 1 页 说明书 8 页

[54] 发明名称 一种定量检测传染性非典型肺炎冠  
状病毒拷贝数的试剂盒

[57] 摘要

本发明提供了一种定量检测传染性非典型肺炎  
冠状病毒拷贝数的试剂盒。该试剂盒标本处理采  
用硅胶柱纯化法,定量检测采用 TagMan 探针荧光  
定量检测原理,定量标准品为体外转录 RNA。

I S S N 1 0 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种定量检测传染性非典型肺炎冠状病毒拷贝数的试剂盒，包含裂解液，硅胶吸附柱，洗涤液，洗脱液，引物，探针，定值标准品，阴性对照样品，和酶混合物，其中，所述裂解液为裂解血清、血浆、液化痰液或漱口水标本中病毒颗粒的硫氰酸胍溶液；所述洗涤液为含乙醇溶液；所述洗脱液为低盐缓冲液或水；所述引物为编码传染性非典型肺炎冠状病毒基因组 orf1ab 区的序列；所述探针为 TaqMan 探针；所述酶混合物为逆转录酶、DNA 扩增酶、dNTP；所述定值标准品为经定量的编码传染性非典型肺炎冠状病毒基因组 orf1ab 区的体外转录 RNA。
2. 如权利要求 1 所述的试剂盒，其中，所述硅胶吸附柱采用负压抽提方法纯化病毒 RNA。
3. 如权利要求 1 所述的试剂盒，其中，所述裂解液中含有浓度为 200-10000 拷贝数/毫升的内参照，探针为 SARS 探针和内参照探针的混合物。
4. 如权利要求 3 所述的试剂盒，其中，所述内参照是包含引物序列和无关质粒序列的体外转录 RNA 片段。
5. 如权利要求 4 所述的试剂盒，其中，内参照所含无关质粒序列来自 pUC18 质粒。
6. 如权利要求 1 所述的试剂盒，其中，所述引物序列为 5' - gtt tat cac ccg cga aga ag -3'和 5' - tct cta gtt gca tga cag ccc t -3'。
7. 如权利要求 1 所述的试剂盒，其中，所述 SARS 探针序列为 5'-FAM-gct cgt gcg tgg att ggc ttt gat-TAMRA-3'。
8. 如权利要求 1 所述的试剂盒，其中，所述定值标准品是由包含传染性非典型肺炎冠状病毒基因组 orf1ab 区基因片段的质粒经扩增、线性化、体外转录后所得到的产物。
9. 如权利要求 8 所述的试剂盒，其中，所述质粒是将 pGEM-T 质粒与用引物 5' - atg aat tac caa gtc aat ggt tac-3'和 5' - cat aac cag tcg gta cag cta c-3'从传染性非典型肺炎冠状病毒感染者液化痰液标本中扩增获得 orf1ab 区基因片段连接获得。

## 一种定量检测传染性非典型肺炎冠状病毒拷贝数的试剂盒

### 技术领域

本发明涉及诊断试剂领域，特别是涉及一种定量检测病毒拷贝数的试剂盒。

### 背景技术

传染性非典型肺炎是一种通过呼吸道传播的疾病，2002 年底在中国广东省首先发现，至 2003 年 5 月，共有 32 个国家和地区有病例报告，累计发病人数超过 6000，死亡率约 5-10%。世界卫生组织将其命名为 Severe Acute Respiratory Syndrome（缩写 SARS，意译为重症急性呼吸道综合症）。经 10 国 13 家研究机构组成的联合研究网络共同研究，世界卫生组织于 2003 年 4 月 16 日确认一株新的冠状病毒为病原体，并命名为 SARS coronavirus，简称 SARS-COV，中文称为“传染性非典型肺炎冠状病毒”。该病毒是一种单链 RNA 病毒，与常见的人类冠状病毒 OC43 和 229E 毒株同源性低于 60%。由于 SARS 早期临床症状易与一般呼吸道疾病混淆，故需要特异性诊断试剂盒进行确诊。同时，在对 SARS 患者抗病毒治疗过程中，也需要定量检测病毒拷贝数以检测治疗效果。

基于 TaqMan 探针的荧光定量 PCR 技术是一种定量检测病毒拷贝数的方法。德国 ATRUS 公司和中国华美生物工程公司已开发出了用上述方法检测 SARS-COV 的试剂盒。但 ATRUS 公司的 HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents 只是一套 PCR 扩增和检测试剂组合，没提供相应的标本处理试剂和方案。而华美生物工程公司的 SARS Coronavirus 核酸扩增（PCR）荧光检测试剂盒只是一种定性试剂盒，无法提供定量病毒拷贝数的检测结果。

本发明提供一种定量检测传染性非典型肺炎冠状病毒拷贝数的试剂盒，克服了上述现有技术的缺陷。

## 发明内容

本发明解决的技术问题是提供了一种定量检测传染性非典型肺炎冠状病毒拷贝数的试剂盒，可以定量检测传染性非典型肺炎冠状病毒拷贝数，克服了现有技术的缺陷。在实践中，既可以对感染 SARS 病毒的人群进行早期临床诊断，也可以对病人的治疗情况进行定量检测，效果极为良好。

本发明的定量测定传染性非典型肺炎冠状病毒拷贝数的试剂盒，包含裂解液，硅胶吸附柱，洗涤液，洗脱液，引物，探针，定值标准品，阴性对照样品，和酶混合物，其中，所述裂解液为裂解血清、血浆、液化痰液或漱口水标本中病毒颗粒的硫氰酸胍溶液；所述洗涤液为含乙醇溶液；所述洗脱液低盐缓冲液或水；所述引物为编码传染性非典型肺炎冠状病毒基因组 orflab 区的序列；所述探针为 TaqMan 探针；所述酶混合物为逆转录酶、DNA 扩增酶、dNTP；所述定值标准品为经定量的编码传染性非典型肺炎冠状病毒基因组 orflab 区的体外转录 RNA。其中，所述硅胶吸附柱采用负压抽提方法纯化病毒 RNA。

本发明的试剂盒对标本处理没有采用类似于中国华美生物工程公司的液相提取法，而是采用硅胶柱吸附纯化法。该技术原应用于各类科研用分子生物学试剂盒，其原理是利用病毒核酸与其他核酸、蛋白质在不同条件下与硅胶吸附柱结合能力的差异，通过负压抽提组件和含乙醇洗涤液，将非病毒核酸类杂质去除，再用低盐或水，将仍吸附于硅胶吸附柱上的病毒洗脱下来。将该技术应用于本诊断试剂盒后，一方面避免了传统方法中使用酚、氯仿、异戊醇等有毒试剂，另一方面引入机械化操作，减少了人为操作因素对结果的影响。本领域技术人员只需自行选用由一个负压形成系统（如真空泵）和一个或若干个与硅胶吸附柱接口组成的负压抽提组件，即可使用本硅胶柱吸附纯化系统。

本发明的试剂盒中所用的引物和探针序列来自于传染性非典型肺炎冠状病毒基因组 orflab 开放读码框架。其特征为传染性非典型肺炎冠状病毒所特有，而其他感染人的病毒所不含有。在特定实施例，本发明所确认的最优引物序列为传染性非典型肺炎冠状病毒 BJ03 病毒株（GenBank 编号 AY278490.3）第 18181-18200bp 和第 18261-18240bp，引物序列为 5' - gtt tat cac ccg cga aga ag -3' 和 5'- tct cta gtt gca tga cag ccc t -3'。探针采用 TaqMan 探针类型，即在探针碱基两段分别标记荧光报告基团和荧光淬灭基团，最优探针序列为传染性非典型肺

炎冠状病毒 BJ03 病毒株 (GenBank 编号 AY278490.3) 第 18212-18235bp, TagMan 探针序列为 5'-FAM-gct cgt gcg tgg att ggc ttg gat-TAMRA-3'。在 PCR 扩增时, 对荧光信号强度进行检测, 信号强度超过检测器阈值时的 PCR 扩增循环次数 ( $C_T$ ) 与标本中模板数成正比。

由于 PCR 扩增易受多种因素影响而扩增失败, 使试剂盒使用人员得出检测标本为阴性的错误结论。为避免试剂盒使用人员得出上述错误判断, 本发明的试剂盒的最优组成中使用内参照扩增质控系统, 即在裂解液中加入特定序列的内参照 RNA, 与标本共同经过裂解、纯化、扩增、检测各步骤。该内参照 RNA 序列为一与待测标本无关的质粒片段 (如 pUC18 质粒片段), 两端含试剂盒中所用的引物序列, 故可与待测标本共用同一对引物扩增。所用内参照探针为包含特异性针对该无关序列的 TagMan 探针。如果检测结果为标本、内参照均为阴性, 则表明扩增失败, 实验结果无效; 如果检测结果为标本阴性、内参照阳性或标本阳性、内参照阳性或标本阳性、内参照阴性, 则结果可信。在特定实施例中, 当试剂盒采用上节所述引物序列时, 所述内参照是将 pGEM-T 质粒与用引物 5' - gtt tat cac ccg cga aga aga aag ttc tgc tat gtg gcg c -3'和 5' - tct cta gtt gca tga cag ccc tga gta ctc aac caa gtc att -3'扩增的 pUC18 质粒片段连接、转化、扩增后, 体外转录获得的 RNA。不含内参照的试剂盒尽管缺少了一道质控标准, 但不影响正常使用。

本发明的试剂盒是一种定量检测试剂盒, 使用中需将待测标本的  $C_T$  值与标准曲线的  $C_T$  值比较, 求出待测标本病毒拷贝数。标准曲线由已知拷贝数标准品同步提取和扩增得到。本发明的试剂盒采用的定值标准品为经定量的编码传染性非典型肺炎冠状病毒基因组 orflab 区片段的体外转录 RNA。其来源是从传染性非典型肺炎患者液化痰液标本中抽提病毒颗粒, RT-PCR 获得 orflab 区片段, 接入质粒后在大肠杆菌内扩增, 最后将质粒线性化后体外转录为 RNA, 并定量。较之常规的是以传染性非典型肺炎患者病毒阳性标本做定值标准品的方法, 本发明的试剂盒在安全性上有显著优势。在特定实施例中, 最优选的体外转录片段是由序列为 5' - atg aat tac caa gtc aat ggt tac-3'[传染性非典型肺炎冠状病毒 BJ03 病毒株 (GenBank 编号 AY278490.3) 第 18149-18172bp]和 5' - cat aac cag tgc gta cag cta c-3'[传染性非典型肺炎冠状病毒 BJ03 病毒株 (GenBank 编号

AY278490.3) 第 18338-18317bp]的引物从病毒颗粒中 RT-PCR 得到。将 pGEM-T 质粒 (Promega 公司) 与上述扩增获得的 orflab 区基因片段连接后在大肠杆菌内扩增, 最后将质粒线性化后体外转录为 RNA。

本发明的试剂盒的阴性对照采用健康人血清 (各传染性指标如 HBV, HCV, HIV, TP 及 SARS 等均为阴性)。

本发明的试剂盒需配合荧光定量 PCR 仪使用。在特定实施例中, 在使用不含内参照的试剂盒配方时, 推荐的 PCR 仪为 ROCHE 公司 Lightcycle 型 PCR 仪。在使用含内参照的试剂盒配方时, 推荐的 PCR 仪为 MJ 公司 DNA Engine Opticon2 型 PCR 仪。本领域技术人员亦可从 BIO-RAD、Applied Biosystems 等公司获得同类的 PCR 仪。

## 具体实施方式

### 实施例 1 SARS-COV 片段体外转录 RNA 的制备与定量

取 SARS 患者液化痰液标本, 用 QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN 公司) 抽提病毒, 按试剂盒使用说明书要求操作。抽提产物经 AMV 逆转录酶 (购自上海生工公司) 逆转录为 cDNA 后, 加下列两条引物和 Tag DNA 聚合酶, 按常规操作 PCR 扩增:

5' - atg aat tac caa gtc aat ggt tac-3'

5' - cat aac cag tcg gta cag cta c-3'

取扩增产物, 与 pGEM-T 质粒 (Promage 公司) 混合后用 T4 连接酶连接, 按 Promage 公司产品说明书操作, 连接产物转化大肠杆菌 DH5  $\alpha$  (GIBCO 公司)。转化方法为标准的钙转化法, 按《分子克隆实验指南 (第二版)》操作。转化菌液涂布含氨苄青霉素的 LB 培养基平板, 次日挑选长出的菌落, 在含氨苄青霉素的 LB 液体培养基内扩大培养。收集菌体, 用大量质粒抽提试剂盒 (上海华舜生物技术公司) 抽提质粒。将所获得的 pGEM-T-SARS 质粒用 SalI 酶切, 0.8%琼脂糖电泳, 胶回收线性化质粒片段。用 RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems 试剂盒 (Promega 公司) 将回收的线性化的质粒体外转录为 RNA, 并用 DNase I 消化 DNA, 酚 (水饱和)/氯仿抽提纯化, 最终溶于 DEPC H<sub>2</sub>O



中。用 HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents 定量试剂盒（ATRUSS 公司）对该体外转录 RNA 进行定量，基本确认为  $1.2 \times 10^{10}$  拷贝/毫升。

## 实施例 2 内参照 RNA 的制备

取 pUC18 质粒（GIBCO 公司），混合下列两条引物和 Tag DNA 聚合酶，按常规操作 PCR 扩增：

5' - gtt tat cac ccg cga aga aga aag ttc tgc tat gtg gcg c -3'

5' - tct cta gtt gca tga cag ccc tga gta ctc aac caa gtc att -3'

取扩增产物，与 pGEM-T 质粒（Promage 公司）混合后用 T4 连接酶连接，按 Promage 公司产品说明书操作，连接产物转化大肠杆菌 DH5  $\alpha$ （GIBCO 公司）。转化方法为标准的钙转化法，按《分子克隆实验指南（第二版）》操作。转化菌液涂布含氨苄青霉素的 LB 培养基平板，次日挑选长出的菌落，在含氨苄青霉素的 LB 液体培养基内扩大培养。收集菌体，用大量质粒抽提试剂盒（上海华舜生物技术公司）抽提质粒。将所获得的质粒用 SalI 酶切，0.8%琼脂糖电泳，胶回收线性化质粒片段。用 RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems 试剂盒（Promega 公司）将回收的线性化的质粒体外转录为 RNA，并用 DNase I 消化 DNA，酚（水饱和）/氯仿抽提纯化，最终溶于 DEPC H<sub>2</sub>O 中，终浓度  $1 \times 10^9$  拷贝/毫升。

## 实施例 3 不含内参照的试剂盒各组分的配制与组装

试剂盒包括标本处理单元和核酸扩增定量检测单元。

标本处理单元采用硫氰酸胍裂解病毒后负压柱纯化方法，要求配合负压抽提组件使用。其组成包括：

- 1.裂解液：4.8 M 硫氰酸胍，50mM Tris；
- 2.硅胶吸附柱；
- 3.洗涤液 I：2 M 硫氰酸胍，25mM Tris，30%乙醇；
- 4.洗涤液 II：2mM NaCl,2mM Tris，80%乙醇；
5. 洗脱液： DEPC 处理过的纯化水

核酸扩增定量检测单元采用荧光定量 PCR 原理，要求配合荧光定量 PCR

仪使用。其组成包括：

1. PCR 反应液：1.8mM dNTP, 3.6mM DTT, 3.6mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.1  $\mu\text{M}$  引物一（序列 5' - gtt tat cac ccg cga aga ag -3'），1.1  $\mu\text{M}$  引物二（序列 5'- tct cta gtt gca tga cag ccc t -3'）及 buffer；
2. 酶混合物：0.6U/ $\mu\text{l}$  AMV 逆转录酶，0.6U/ $\mu\text{l}$  Tag DNA 聚合酶，1U/ $\mu\text{l}$  RNA 酶抑制剂；
3. 探针：10  $\mu\text{M}$  探针（序列 5'-FAM-gtt cgt gcg tgg att ggc ttt gat-TAMRA-3'）
4. 阴性对照：健康人血清；
5. 定量对照：经稀释得到的拷贝数分别为  $1 \times 10^2/\text{ml}$ 、 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 、 $1 \times 10^6/\text{ml}$  的三支 SARS-COV 片段体外转录 RNA

#### 实施例 4 含内参照的试剂盒各组分的配制与组装

试剂盒包括标本处理单元和核酸扩增定量检测单元。

标本处理单元采用硫氰酸胍裂解病毒后负压柱纯化方法，要求配合负压抽提组件使用。其组成包括：

1. 裂解液：4.8 M 硫氰酸胍，50mM Tris，5000 拷贝/毫升内参照 RNA；
2. 硅胶吸附柱；
3. 洗涤液 I：2 M 硫氰酸胍，25mM Tris，30%乙醇；
4. 洗涤液 II：2mM NaCl, 2mM Tris，80%乙醇；
5. 洗脱液：DEPC 处理过的纯化水

核酸扩增定量检测单元采用荧光定量 PCR 原理，要求配合荧光定量 PCR 仪使用。其组成包括：

1. PCR 反应液：1.8mM dNTP, 3.6mM DTT, 3.6mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.1  $\mu\text{M}$  引物一（序列 5' - gtt tat cac ccg cga aga ag -3'），1.1  $\mu\text{M}$  引物二（序列 5'- tct cta gtt gca tga cag ccc t -3'）及 buffer；
2. 酶混合物：0.6U/ $\mu\text{l}$  AMV 逆转录酶，0.6U/ $\mu\text{l}$  Tag DNA 聚合酶，1U/ $\mu\text{l}$  RNA 酶抑制剂；
3. 探针：10  $\mu\text{M}$  MSARS 探针（序列 5'-FAM-gtt cgt gcg tgg att ggc ttt gat-TAMRA-3'），5  $\mu\text{M}$  内参照探针（序列 5'-HEX-aag ttc tgc tat gtg gcg cgg tat-

## TAMRA-3')

4.阴性对照：健康人血清；

5.定量对照：经稀释得到的拷贝数分别为  $1 \times 10^2/\text{ml}$ 、 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 、 $1 \times 10^6/\text{ml}$  的三支 SARS-COV 片段体外转录 RNA

## 实施例5 试剂盒的使用

取7个1.5 ml离心管，编号P1、P2、P3、S0、S1、S2、S3，每管分别加入不同标本100  $\mu\text{l}$ （见下表）：

编号	标本
P1	上海第4例SARS患者住院第9天血清
P2	上海第5例SARS患者住院第12天漱口水
P3	上海第6例SARS患者住院第2天血清
S0	阴性对照
S1	定量对照I
S2	定量对照II
S3	定量对照III

用带滤芯吸嘴反复吹打5次后，再分别用带滤芯吸嘴加入100  $\mu\text{l}$ 裂解液，盖上管盖，振荡混匀，离心数秒，置70℃反应10分钟，再用带滤芯吸嘴加入110  $\mu\text{l}$ 无水乙醇，振荡混匀，离心数秒。将7支作好标记的硅胶吸附柱固定在连接有真空泵（上海博汇真空泵厂）的接口基座上，将上述离心管内液体移入硅胶吸附柱，开启真空泵，把柱内的液体全部抽干。随后在每个柱内加入500  $\mu\text{l}$ 洗涤液I，再开启真空泵，把柱内的液体全部抽干。再在每个柱内加入500  $\mu\text{l}$ 洗涤液II，再开启真空泵，把柱内的液体全部抽干。然后从接口基座上取下硅胶吸附柱，将其放入2ml离心管中，盖上管盖，14000rpm离心1分钟。最后将柱放入新的2ml离心管中，在柱面中央各加50  $\mu\text{l}$ 洗脱液，静置1分钟后10000rpm离心1分钟，取2ml离心管中的收集液10  $\mu\text{l}$ 做PCR反应模板。

取PCR反应液56  $\mu\text{l}$ ，酶混合物20  $\mu\text{l}$ ，荧光探针4  $\mu\text{l}$ 混合，充分混匀后离心数秒，分装至PCR毛细反应管中，每管10  $\mu\text{l}$ ，再分别加入10  $\mu\text{l}$ 已处理好的标本（即

上述离心管中的洗脱液), 离心数秒后放入LightCycler扩增仪进行扩增检测, 参数设定为:

Slope (°C/sec)	Acquisition Mode	Program	Cycles	Temperature Target (°C)	Hold Time (min: sec)
20	None	1	1	55	16: 00
20	None	2	1	94	1: 40
20	None	3	5	94	1
20	None			50	15
20	None			72	12
20	None	4	42	92	1
20	Single			58	42
20	None	5	1	35	30

选F1或F1/F2荧光检测通道, 将S1、S2、S3的拷贝数和对应 $C_T$ 值做标准曲线, 根据P1、P2、P3的CT值, 在标准曲线上得到相应的拷贝数, 结果如下:

编号	病毒拷贝数 (copies/ml)
P1	20
P2	$3.3 \times 10^4$
P3	23

根据本发明的公开内容, 本领域的熟练技术人员无须过多实验即可对本发明所要求保护的定量检测传染性非典型肺炎冠状病毒拷贝数的试剂盒进行实施, 并达到预期效果。本发明公开的实施例仅是对本发明进行详细描述, 但并不是构成对本发明的限制。本领域的熟练技术人员用显而易见的相似替代物或改造, 或用某些在化学上或生理上相关的制剂替代在此描述的制剂, 或对本发明的有关内容进行变动, 但不超出本发明的精神、范围和思想, 均落入本发明要求保护的范围。